

棉蚜溶菌酶基因 *AgLYS* 的克隆与表达分析

张元臣, 刘向东*

(南京农业大学植物保护学院, 南京 210095)

摘要:【目的】克隆棉蚜 *Aphis gossypii* Glover 溶菌酶基因并进行原核表达, 分析其在不同日龄和不同寄主植物上棉蚜体内的表达特征, 为进一步研究溶菌酶的功能及其与棉蚜共生菌间的关系奠定基础。【方法】以无翅棉蚜成虫总 RNA 为模板, 采用 RT-PCR 与 RACE 方法获得棉蚜溶菌酶基因的 cDNA 全长序列; 将信号肽序列剪切后的棉蚜溶菌酶基因片段连接到原核表达载体 pET-30a, 并转化到大肠杆菌 *Escherichia coli* 中进行诱导表达; 采用定量 PCR 方法测定该基因在不同日龄(1–19 日龄)以及西葫芦、黄瓜和豇豆等不同寄主植物上棉蚜体内的相对表达量。【结果】克隆获得棉蚜溶菌酶基因, 命名为 *AgLYS* (GenBank 登录号: KY575341), cDNA 全长为 680 bp, 开放阅读框为 516 bp, 编码 172 个氨基酸残基。*AgLYS* 的 N-末端含有长度为 36 个氨基酸残基的信号肽序列。系统发育分析表明, 棉蚜溶菌酶属于 i 型溶菌酶, 并且与豌豆蚜 *Acyrtosiphon pisum* i 型溶菌酶基因的氨基酸序列一致性达 90%。*AgLYS* 可在大肠杆菌中诱导表达, 表达蛋白分子量为 20 kD 左右。*AgLYS* 在 1–19 日龄的棉蚜体内均有表达, 但在 1–9 日龄棉蚜体内表达量较低, 11 日龄后的棉蚜体内表达量极显著升高 ($P < 0.01$)。同时, 在西葫芦上饲养的棉蚜体内 *AgLYS* 的表达量极显著高于在黄瓜和豇豆上饲养的棉蚜体内的表达量 ($P < 0.01$)。【结论】从棉蚜中克隆获得了 i 型溶菌酶基因 *AgLYS*, 并在大肠杆菌中诱导表达。棉蚜 *AgLYS* 基因的表达量受蚜虫日龄及所取食寄主种类的影响, 推测棉蚜 i 型溶菌酶 *AgLYS* 可能与棉蚜体内共生菌种群密度的调控相关。

关键词: 棉蚜; 溶菌酶; 基因克隆; 基因表达; 原核表达; 寄主植物

中图分类号: Q966 文献标识码: A 文章编号: 0454-6296(2017)02-0127-09

Cloning and expression analysis of lysozyme gene *AgLYS* in the cotton-melon aphid, *Aphis gossypii* (Hemiptera: Aphididae)

ZHANG Yuan-Chen, LIU Xiang-Dong* (College of Plant Protection, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

Abstract: 【Aim】 This study aims to clone the lysozyme gene of the cotton-melon aphid *Aphis gossypii* Glover, to construct the expression system of this gene in *Escherichia coli*, and to analyze its expression profiles in aphids of different day-old and reared on different host plants, so as to further research the biological function of this gene and to illustrate the relationship between lysozyme and symbionts in aphids. 【Methods】 The total RNA was extracted from apterous adults of *A. gossypii* and used as the template to clone lysozyme gene and to obtain the full-length cDNA sequence using RT-PCR and RACE techniques. The gene fragment of lysozyme gene in *A. gossypii* without signal peptide sequence was linked to the expression vector pET-30a and then transformed into *E. coli* to express. The qRT-PCR method was used to examine the relative expression levels of the lysozyme gene in *A. gossypii* of different day-old (1–19-day-old) and reared on different host plants (zucchini, cucumber and cowpea). 【Results】 A lysozyme gene was cloned from apterous aphids of *A. gossypii* and named *AgLYS* with the GenBank accession no. KY575341. The full-length cDNA of *AgLYS* is 680 bp, and its ORF is 516 bp

基金项目: 国家自然科学基金项目(31672034); 江苏省自然科学基金项目(BK20141368)

作者简介: 张元臣, 男, 1984 年生, 河南方城人, 博士研究生, 主要从事昆虫生态研究, E-mail: 2012202033@njau.edu.cn

* 通讯作者 Corresponding author, E-mail: liuxd@njau.edu.cn

收稿日期 Received: 2016-11-26; 接受日期 Accepted: 2017-01-22

which encodes 172 amino acid residues. A signal peptide sequence with 36 amino acid residues was found at the N-terminus. The phylogenetic analysis showed that the lysozyme of *A. gossypii* belongs to i-type and has 90% amino acid sequence identity with that of the pea aphid *Acyrtosiphon pisum*. *AgLYS* was expressed in *E. coli*, and the expressed protein has the molecular weight of approximate 20 kD. *AgLYS* could be expressed in 1–19-day-old *A. gossypii* aphids. Its expression levels were lower in 1–9-day-old aphids, but increased extremely significantly in 11–19-day-old aphids ($P < 0.01$). The expression levels of *AgLYS* were extremely significantly higher in *A. gossypii* aphids reared on zucchini than in those reared on cucumber and cowpea ($P < 0.01$). 【Conclusion】 Lysozyme i-type was found in *A. gossypii*, and *AgLYS* was cloned and expressed in *E. coli*. The expression of *AgLYS* is influenced by developmental stages of *A. gossypii* and host plants. It is inferred that *AgLYS* might be involved in the regulation of population density of symbionts in *A. gossypii*.

Key words: *Aphis gossypii*; lysozyme; gene cloning; gene expression; prokaryotic expression; host plant

溶菌酶存在于自然界的大部分生物体内。它能水解细菌细胞壁中由 N-乙酰胞壁酸与 N-乙酰氨基葡萄糖连接形成肽聚糖的 β -1, 4 糖苷键, 而引起细菌细胞的裂解 (Jollès and Jollès, 1984)。溶菌酶作为抗菌和免疫调节剂, 可参与生物的防御过程 (Jollès and Jollès, 1984; Callewaert and Michiels, 2010)。溶菌酶还具有消化酶活性, 能够分解微生物为生物体提供生长发育所需要的 C 和 N 源 (Dobson *et al.*, 1984; Bachali *et al.*, 2002)。现在已知的溶菌酶可以分为 6 大类, 分别是 c 型 (chicken-type)、g 型 (goose-type)、i 型 (invertebrate-type)、噬菌体型 (phage-type)、细菌型 (bacterial-type) 和植物型 (plant-type) (Jollès and Jollès, 1984)。动物体内只发现了 c 型、g 型和 i 型溶菌酶, 它们也被称为动物源溶菌酶 (Callewaert and Michiels, 2010; 张鹏等, 2012)。i 型溶菌酶最早在海星 *Asterias rubens* 中被发现, 然后相继在环节动物、线虫、节肢动物、棘皮动物和软体动物中被发现 (Ito *et al.*, 1999; Nilsen and Myrnes, 2001; Bachali *et al.*, 2002; Callewaert and Michiels, 2010)。

昆虫是唯一发现同时具有 c 型和 i 型溶菌酶的种类 (Paskewitz *et al.*, 2008; Callewaert and Michiels, 2010; Gerardo *et al.*, 2010)。随着基因组学和蛋白质组学的发展, i 型溶菌酶在很多昆虫中被发现, 如双翅目冈比亚按蚊 *Anopheles gambiae* (Paskewitz *et al.*, 2008) 和黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster* (Smith *et al.*, 2007), 鞘翅目异色瓢虫 *Harmonia axyridis* (Vilcinskis *et al.*, 2013), 鳞翅目大蜡螟 *Galleria mellonella* (Yu *et al.*, 2002) 和家蚕 *Bombyx mori* (International Silkworm Genome Consortium, 2008), 半翅目豌豆蚜 *Acyrtosiphon pisum* (Gerardo *et al.*, 2010) 和烟粉虱 *Bemisia tabaci*

(于洁等, 2016), 以及膜翅目佛罗里达弓背蚁 *Camponotus floridanus* (Ratzka *et al.*, 2013) 和西方蜜蜂 *Apis mellifera* (Evans *et al.*, 2006)。溶菌酶在昆虫的免疫防御中起重要作用 (Cong *et al.*, 2009; Bathige *et al.*, 2013)。冈比亚按蚊 *A. gambiae* 吸血后, 其中肠内的细菌含量会显著增加 (Demaio *et al.*, 1996), 同时中肠内 i 型溶菌酶的表达水平也显著上升 (Paskewitz *et al.*, 2008)。接种大肠杆菌的免疫组黄粉虫幼虫血淋巴中溶菌酶活性在各温度下均显著高于未免疫组 (陶淑霞等, 2014); 柞蚕和家蚕蛹受大肠杆菌诱导后, 其体内溶菌酶活性都比诱导前明显提高 (屈贤铭等, 1985)。

蚜虫会受到多种致病微生物和寄生生物的感染 (冯明光和 Poprawski, 1998; Hufbauer, 2002; Snyder and Ives, 2003), 但是蚜虫又缺失组成免疫系统的一些重要基因, 如抗菌肽 (Gerardo *et al.*, 2010)。因此, 溶菌酶很可能在蚜虫的免疫系统中发挥重要作用。棉蚜 *Aphis gossypii* Glover 作为一种多食性的世界性害虫, 已对不同化学药剂产生了不同程度的抗性 (崔丽等, 2016; 张帅等, 2016), 因此对棉蚜的防控不能仅依赖于化学药剂, 还需要加强棉蚜-寄主植物-病原菌或共生菌三者间相互关系的调节, 以增强和改善生物防治的效果, 从而实现棉蚜的可持续绿色防控。溶菌酶对病原菌的防御作用, 会降低生防微生物对害虫的控制效果。目前, 棉蚜体内的溶菌酶种类和表达情况还不清楚, 因此, 本研究运用 RT-PCR 和 RACE 技术对棉蚜的溶菌酶基因进行克隆, 并采用定量 PCR 方法检测了该基因在不同日龄和不同寄主植物上棉蚜体内的表达水平, 以期为进一步研究该类溶菌酶在棉蚜体内的生理功能奠定基础。

1 材料与方法

1.1 供试棉蚜

本实验所用的无翅棉蚜成虫于 2002 年采自于南京市卫岗的黄瓜地,并在室内光照培养箱(25 ± 1℃、RH 80%、光周期 14L: 10D)中用黄瓜苗饲养。本研究所用的黄瓜品种为露丰(江蔬种苗科技有限公司),西葫芦品种为新早青一代(山西三晋种业),豇豆品种为澳华长龙(澳华科农种子有限公司)。3 种植物均在温室内用塑料杯在珍珠岩基质中种植,并定期浇灌培养液,具 4 叶后用于饲养棉蚜。无翅棉蚜样品收集后立即加入 Trizol 试剂,并放入液氮中快速冷冻后,置于 -70℃ 冰箱中保存备用。

1.2 棉蚜溶菌酶基因片段的克隆

根据棉蚜表达文库得到的棉蚜溶菌酶基因片段,设计特异性引物 LYS-1F 和 LYS-1R(表 1),以 50 头 5 日龄无翅棉蚜的总 RNA[采用 Trizol 试剂盒(Invitrogen 公司)提取]为模板合成 cDNA 第一链。以反转录合成的 3 μL cDNA 为模板,加入 12.5 μL mix(TaKaRa 公司)、正反向引物各 1 μL (10 mmol/L)和 7.5 μL ddH₂O 补足至 25 μL 后混匀,在掌型离心机中简单离心后,放入 Eppendorf PCR 仪中扩增。PCR 反应条件:94℃ 预变性 5 min;94℃ 变性 1 min,58℃ 复性 30 s,72℃ 延伸 30 s,共 35 个循环;72℃ 总延伸 10 min,4℃ 保存。扩增产物用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳分离并检测,并用 Wizard DNA Gel Extraction Kit 试剂盒回收目的条带。将回收产物连

接到 PEAST-T3 载体上,并转化到大肠杆菌 DH5α 中培养,而后挑取白色菌落接种于含有 100 μg/μL 氨苄的 LB 培养液中,过夜震荡培养后提取质粒,采用菌液 PCR 方法鉴定重组阳性克隆,并将含有目的片段的菌液送南京金斯瑞生物科技有限公司进行测序。

1.3 棉蚜溶菌酶基因 cDNA 的 5'末端和 3'末端扩增

根据获得的 cDNA 序列,分别设计合成 5'末端和 3'末端的特异性引物 AGGSP1-5'和 AGGSP1-3'(表 1),按 RACE 试剂盒提供的方法分别进行 5'端和 3'端巢式 PCR 扩增。扩增反应体系:3 μL cDNA 模板、5 μL 10 × Taq buffer (Mg²⁺ free)、4 μL MgCl₂ (25 mmol/L)、4 μL dNTP mixture (2.5 mmol/L)、各 1 μL 的上下游引物 (10 mmol/L)、0.5 μL Taq polymerase (TaKaRa 公司)、31.5 μL ddH₂O,总体积为 50 μL。扩增条件:94℃ 2 min;10 个循环(94℃ 15 s,退火温度由 65℃ 降至 55℃ 每循环降 1℃,退火时间 30 s,72℃ 40 s)之后扩增 25 个循环(94℃ 15 s,55℃ 30 s,72℃ 40 s);72℃ 延伸 10 min。扩增产物经电泳检测发现,5'端通过一轮扩增即可获得明显的目的片段。3'端在第 1 轮扩增中没有得到目的片段,而继续进行第 2 轮扩增。将 3'端第 1 轮 PCR 产物稀释 50 倍作为模板,利用设计合成的 3'末端扩增引物 AGNGSP2-3'(表 1)继续进行扩增,扩增体系与第 1 轮相同,扩增条件:94℃ 2 min;94℃ 15 s,55℃ 30 s,72℃ 40 s 条件下扩增 35 个循环;72℃ 延伸 10 min。5'和 3'端的扩增产物分别经电泳、条带回收、连接和转化后进行序列测定。

表 1 本研究所用的引物序列
Table 1 Primer sequences used in this study

引物名称 Primer name	引物序列(5' - 3') Primer sequence	扩增片段长度(bp) Amplicon size	用途 Purpose
LYS-1F LYS-1R	ATGACGCGTAACCCGTCCGG ACTTTCCTCTGTTGTTGAC	500	溶菌酶基因 cDNA 开放阅读框扩增 Amplification of ORF of LYS cDNA
AGGSP1-5'	GTAACACAAGCACCTCAT		5'端 RACE 5' RACE
AGGSP1-3'	TTACTGCGGTCCTTACTAC		3'端第 1 轮扩增 1st round PCR of 3' RACE
AGNGSP2-3'	GTGACGGATTGTGATGATT		3'端第 2 轮扩增 2nd round PCR of 3' RACE
LYS-3F LYS-3R	ACGGATTGTGATGATTACG ACTTTCCTCTGTTGTTGAC	121	溶菌酶基因定量 PCR qRT-PCR of LYS
AG18sRNA-F AG18sRNA-R	GAAAGATTGACAGATTGAGAG TACTTAGCAGGACAGAGT	124	内参基因扩增 Amplification of the reference gene
LYS-4F LYS-4R	GAATTCGGCCGATACGTGTCCAACCTTGAA AAGCTTTCAGTTAAACTTTCCTCTGTTG	405	原核表达载体的构建 Construction of prokaryotic expression vector

1.4 棉蚜溶菌酶基因原核表达载体的构建与诱导表达

以连接棉蚜溶菌酶基因的 pEASY-T3 质粒为模板,利用带有酶切位点的引物 LYS-4F 和 LYS-4R (表 1) 进行 PCR 扩增,该引物不能扩增溶菌酶基因的信号肽部分(即信号肽被剪切),扩增体系和条件如 1.2 节;将目的产物回收并连接到 pEASY-T3 载体上,并采用 PCR 扩增方法鉴定出阳性克隆;将阳性克隆的质粒用 *EcoR* I 和 *Hind* III 进行双酶切,酶切产物经琼脂糖电泳回收大小约为 400 bp 左右的片段,用 T4 DNA 连接酶将该片段与经过同样双酶切的大肠杆菌表达载体 pET-30a 连接,连接产物转化至大肠杆菌 DH5 α 中,并在含有卡纳霉素的 LB 固体培养基上进行蓝白斑筛选,通过 PCR 筛选阳性克隆,构建出重组了棉蚜溶菌酶基因的质粒 pET-30a-LYS。

将 pET-30a-LYS 质粒导入大肠杆菌 BL21 (DE3) 后,挑取单菌落接种到 10 mL 含有卡纳霉素 (150 mg/L) 的 LB 液体培养基中,37℃ 12 h 培养后,按 1:50 的比例(v/v)接种于 15 mL LB 液体培养基中,培养至 OD₆₀₀ = 0.6 左右时,分别加入 0, 1, 4, 7 和 10 μ L 异丙基硫代半乳糖苷 (IPTG, 40 mg/mL), 在 25℃ 下诱导表达 8 h, 并进行 SDS-PAGE 蛋白电泳,检测棉蚜溶菌酶基因目标蛋白的表达情况。电泳结果显示 1 μ L IPTG 诱导中目标蛋白的表达量最高,因此取 2 mL 经该条件下诱导的大肠杆菌菌液,经 12 000 r/min 离心,0.01 mol/L PBS 缓冲液 (pH 8.0) 悬浮后,用超声波裂解 (400 W, 超声 2 s, 间隔 10 s, 重复 60 次),然后在 12 000 r/min 条件下离心裂解液 10 min,分离出上清和沉淀。在上清和沉淀中分别加入 2 $\times$ SDS 上样缓冲液并混匀,水浴煮沸 10 min,用 5% 的浓缩胶和 12% 的分离胶进行 SDS-PAGE 电泳,检测棉蚜溶菌酶基因的外源表达蛋白在上清和沉淀包涵体中的分布情况。

1.5 不同日龄和不同寄主植物上棉蚜溶菌酶基因的表达量测定

分别取 700 ng 1 - 19 日龄无翅棉蚜提取总 RNA,以 18S rRNA 基因为内参,反转录后进行荧光定量 PCR,所用引物序列见表 1。在反转录前用 gDNA Eraser 处理总 RNA 去除基因组 DNA。荧光定量 PCR 扩增条件:95℃ 30 s;95℃ 5 s,60℃ 34 s,40 个循环。每个样品重复测定 3 次,每日龄棉蚜设 3 个生物学重复。

将 20 头黄瓜上饲养的棉蚜母蚜分别转接到新

鲜的黄瓜、豇豆和西葫芦叶片上产仔 10 h,保留 20 头仔蚜后挑除母蚜。棉蚜分别在这 3 种植物叶片上连续饲养到第 5 代时,收集 15 头 5 日龄无翅棉蚜进行 RNA 提取和棉蚜溶菌酶基因相对表达量的定量 PCR 检测,测定方法同上。不同寄主植物上饲养的棉蚜分别做 3 ~ 4 次生物学重复。

1.6 数据分析

棉蚜溶菌酶基因完整阅读框用 ORF finder 软件预测,信号肽使用 SignalP4.1 server 进行在线分析。氨基酸序列分析采用生物信息学在线工具 (http://www.expasy.org/tools/pi_tool.html) 进行。基因同源性比较采用 NCBI 中的 BLAST 工具分析。不同物种溶菌酶基因序列经 ClustalW 比对后,用 MEGA 6.0 软件中的邻接法 (NJ),在 1 000 次 bootstrap 检测后构建出系统发育树。

棉蚜溶菌酶基因的相对表达量采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法计算。基因相对表达量在不同日龄或不同寄主植物上的棉蚜间的差异显著性均采用 Tukey 氏多重比较法判断。统计分析在 IBM SPSS Statistics 19 中进行。

2 结果

2.1 棉蚜溶菌酶基因的全长与序列分析

以反转录合成的无翅棉蚜 cDNA 第 1 链为模板,利用 LYS-1F 和 LYS-1R 引物进行 PCR 扩增,获得了大小约 500 bp 的目的条带 (图 1: A)。该条带测序结果与豌豆蚜的溶菌酶基因序列的一致性达 90%,说明所获得的基因为棉蚜的溶菌酶基因,将其命名为 *AgLYS* (GenBank 登录号: KY575341)。*AgLYS* 基因 5' 端和 3' 端分别有 187 和 271 个碱基 (图 1: B)。5' 端测序获得的核苷酸与 cDNA 片段有 147 个碱基重复,而 3' 端与 cDNA 片段有 129 个碱基重复,表明 5' 端和 3' 端测序结果与 cDNA 来源同一基因,并且 *AgLYS* 基因的全长约为 680 bp (图 2)。

ORF Finder 预测结果表明,棉蚜 *AgLYS* 基因 cDNA 编码区全长为 516 bp,5' 端非编码区长 25 bp,3' 端非编码区长 139 bp,推导编码 172 个氨基酸残基,预测信号肽的切口在 N 端的第 36 - 37 氨基酸残基之间 (图 2)。

2.2 棉蚜 *AgLYS* 与其他物种溶菌酶基因的氨基酸序列比对

在 NCBI 上通过 BLASTp 比对,棉蚜 *AgLYS* 与半翅目豌豆蚜和褐飞虱 *Nilaparvata lugens* 的溶菌酶基

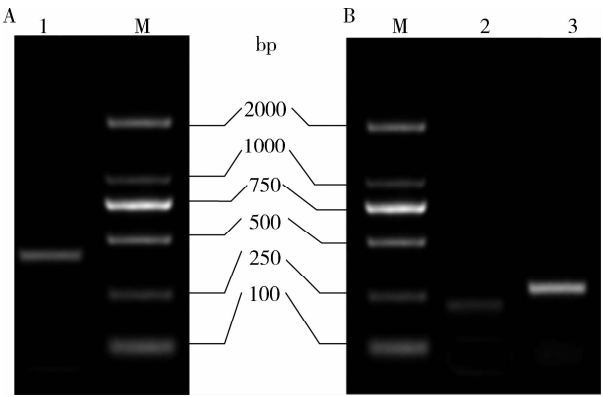


图 1 *AgLYS* 基因的 PCR 扩增产物

Fig. 1 PCR amplification product of *AgLYS*

A: 溶菌酶基因 cDNA 片段扩增 Amplification of cDNA of *AgLYS*; B: 溶菌酶基因 3' 和 5' 端 RACE 扩增 Amplification of *AgLYS* in 3' and 5' RACE. M: DNA 分子量标准 DNA marker; 1: *AgLYS* 基因 cDNA 片段扩增产物 PCR product of *AgLYS* cDNA; 2: *AgLYS* 基因 5' 端 RACE 扩增产物 Amplification product of *AgLYS* in 5' RACE; 3: *AgLYS* 基因 3' 端 RACE 扩增产物 Amplification product of *AgLYS* in 3' RACE.



图 2 棉蚜 *AgLYS* 基因核苷酸序列及推导的氨基酸序列

Fig. 2 Nucleotide and deduced amino acid sequences of *AgLYS* of *Aphis gossypii*

方框内是预测的信号肽。The putative signal peptide is boxed.

因氨基酸序列一致性高,分别为 90% 和 53%;与鞘翅目赤拟谷盗 *Tribolium castaneum* 溶菌酶基因氨基酸序列一致性为 45%。系统发育树结果表明,棉蚜溶菌酶与其他昆虫和海洋动物的 i 型溶菌酶聚集在一起,属于 i 型溶菌酶(图 3)。

2.3 去掉信号肽序列的 *AgLYS* 在大肠杆菌中的诱导表达与检测

将重组质粒 pET-30a-LYS 测序,结果表明,目的基因 *AgLYS* 插入到了正确的位置,并且读码框正

确。*AgLYS* 重组后的大肠杆菌经 1,4,7 和 10 μ L IPTG (40 mg/mL) 诱导 8 h 后,都表达出了 20 kD 左右大小的目的蛋白,而没有 IPTG 诱导的对照组没有该蛋白的表达(图 4)。

2.4 *AgLYS* 表达蛋白的可溶性检测

经 1 μ L IPTG 诱导的含有 pET-30a-LYS 质粒的大肠杆菌,用超声波裂解后,其上清及沉淀包涵体中均存在 20 kD 的蛋白(图 5),由此说明 *AgLYS* 表达的融合蛋白能以可溶性蛋白和包涵体两种形式存在。

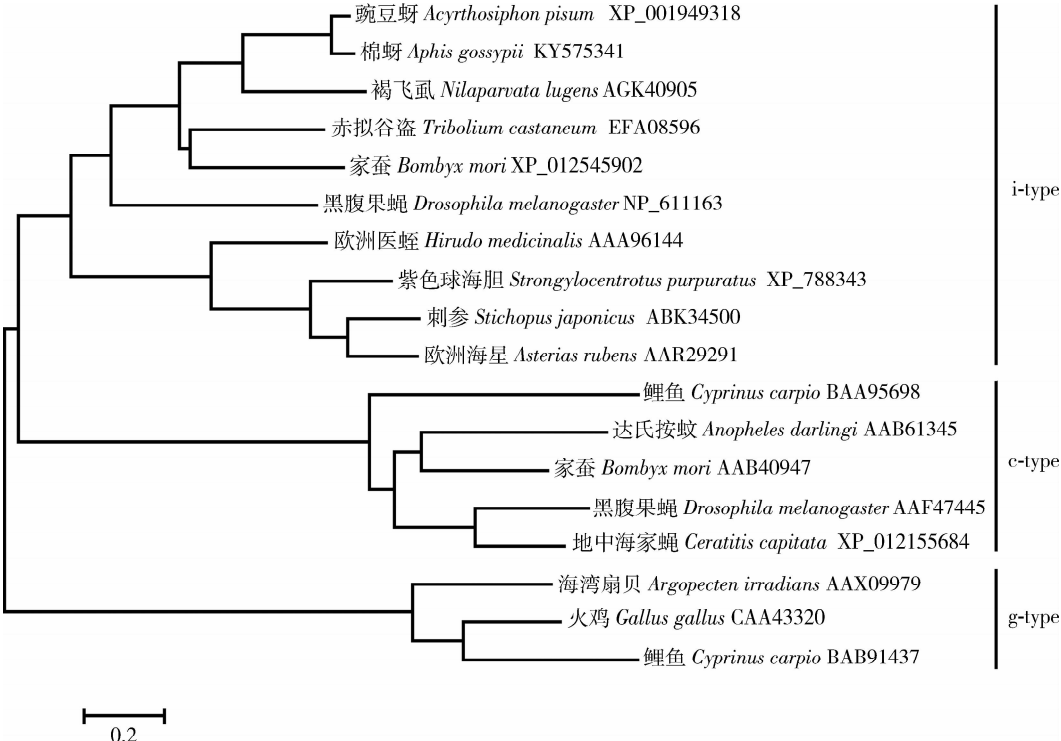


图3 棉蚜与其他物种基于溶菌酶基因氨基酸序列的系统发育树

Fig. 3 Phylogenetic tree of lysozyme genes of *Aphis gossypii* and other species based on amino acid sequences

采用邻接法,自举检验 1 000 次;图中标尺为遗传距离。Neighbor Joining method, with 1 000 bootstrap replicates. The scale bar represents the genetic distance.

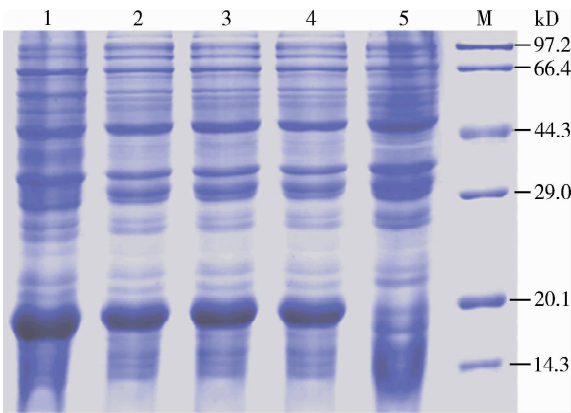


图4 *AgLYS* 在大肠杆菌中经 IPTG 诱导表达的重组蛋白

Fig. 4 Recombinant protein of *AgLYS* expressed in *Escherichia coli* induced by IPTG

M: 蛋白质分子量标准 Protein molecular weight marker; 1 – 5: 分别经 1, 3, 7, 10 和 0 μ L IPTG 诱导 8 h 表达蛋白 Recombinant proteins induced by 1, 3, 7, 10 and 0 μ L IPTG, respectively, for 8 h.

2.5 不同日龄和不同寄主植物上棉蚜体内 *AgLYS* 的表达量

不同日龄的棉蚜 *AgLYS* 的相对表达量存在极显著差异 ($F_{9,27} = 36.036$, $P < 0.001$), *AgLYS* 在 1 –

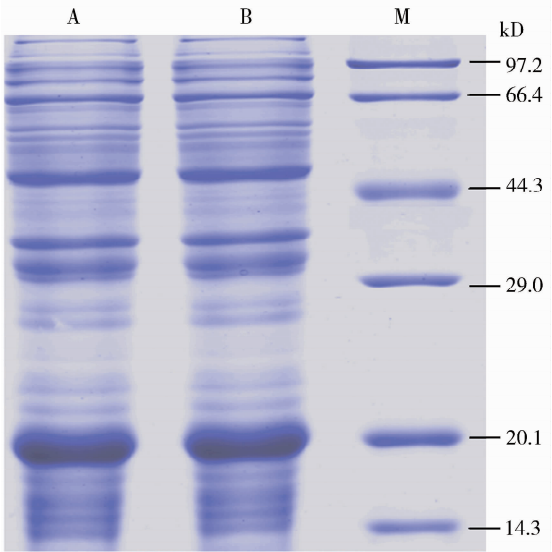


图5 大肠杆菌裂解液上清和沉淀中的 *AgLYS* 蛋白

Fig. 5 *AgLYS* protein in the supernatant fluid and sediment of lysis buffer of *Escherichia coli*

A: 上清 Supernatant; B: 沉淀 Sediment; M: 蛋白质分子量标准 Protein molecular weight marker.

9 日龄棉蚜体内表达量较低,在 11 日龄后棉蚜体内表达量升高,而在 17 – 19 日龄棉蚜体内表达量最高

(图 6: A)。不同寄主上饲养的棉蚜体内 *AgLYS* 表达量也存在极显著差异 ($F_{2,6} = 27.176$, $P =$

0.001), 在西葫芦上棉蚜体内 *AgLYS* 的表达量极显著高于豇豆和黄瓜上棉蚜的表达量(图 6: B)。

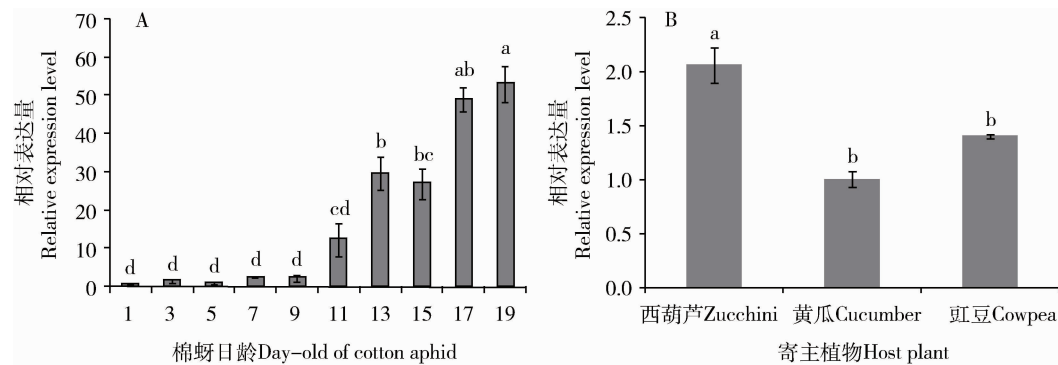


图 6 不同日龄(A)和不同寄主植物上饲养 5 日龄(B)无翅棉蚜体内 *AgLYS* 基因的相对表达量
Fig. 6 Relative expression levels of *AgLYS* in apterous *Aphis gossypii* aphids of different day-old (A) and 5 day-old reared on different host plants (B)

图中数据为平均数 ± 标准误; 柱上不同字母表示 *AgLYS* 表达量间存在极显著差异 (Tukey 氏多重比较法, $P < 0.01$)。Data are mean ± SE. Different letters above bars indicate extremely significant difference in *AgLYS* expression levels (Tukey's range test, $P < 0.01$).

3 讨论

本研究利用 RT-PCR 和 RACE 技术获得了第一条棉蚜溶菌酶基因序列,其开放阅读框为 516 bp,编码 172 个氨基酸残基,N 端 36 个氨基酸残基为信号肽序列。通过与 GenBank 中其他物种的溶菌酶氨基酸序列比对,棉蚜与豌豆蚜的溶菌酶编码氨基酸序列一致性很高(90%),而与褐飞虱的为 53%。基于溶菌酶基因编码氨基酸序列的物种系统进化树结果表明,所得 *AgLYS* 与其他物种的 i 型溶菌酶聚于一类,由此推测,所获得的棉蚜溶菌酶属于 i 型。

有研究表明,i 型溶菌酶具有抗菌和消化双重活性(Jollès and Jollès, 1984; Bachali *et al.*, 2002; Callewaert and Michiels, 2010)。溶菌酶基因可能参与了烟粉虱对真菌侵染的免疫反应(于洁等, 2016)。绝大多数蚜虫体内都含有共生细菌,如 *Buchnera aphidicola*, *Regiella insecticola* 和 *Richettisia* 等(Douglas, 1996; Koga *et al.*, 2003; Sakurai *et al.*, 2005; Lukasik *et al.*, 2013)。研究表明,豌豆蚜 i 型溶菌酶基因很可能在降解 *Buchnera* 菌的过程中起重要作用(Nakabachi *et al.*, 2005; Nishikori *et al.*, 2009)。棉蚜体内含有 *Buchnera* 共生菌,并且西葫芦上饲养的棉蚜 *Buchnera* 菌含量显著高于黄瓜和棉花上的棉蚜(Zhang *et al.*, 2016)。本研究发现,棉蚜饲养到西葫芦上后,其溶菌酶基因的表达量显著上升,这种上升很可能是为了降解高密度的

Buchnera 菌。另外,1 – 9 日龄棉蚜体内溶菌酶基因的表达量很低,但在 11 – 19 日龄期显著升高。冈比亚按蚊 i 型溶菌酶基因的表达模式与棉蚜的类似(Paskewitz *et al.*, 2008)。前人研究表明,豌豆蚜虫体内的 *Buchnera* 共生菌密度随蚜虫日龄的增加呈现出先升高后下降的趋势,并且在出生后 10 d 左右达到最高,然后开始下降(Koga *et al.*, 2003)。我们检测棉蚜体内 *Buchnera* 密度时也发现有随日龄增加而先增高后下降的趋势。因此,我们推测蚜虫体内的溶菌酶基因在蚜虫防御病菌侵染过程中起重要作用,并且该基因的表达与蚜虫体内的共生菌密度相关联,随蚜虫体内共生菌数量的增加而上调表达,从而能起到有效降解细菌的作用。不过,棉蚜的溶菌酶与共生菌种群密度的关系还需要进一步研究。

迄今为止,已在很多海洋动物上得到了 i 型溶菌酶基因序列,并对其在大肠杆菌中的表达、产物的纯化、抗菌作用、抗菌条件的优化等已有一些研究(Matsumoto *et al.*, 2006; Itoh and Takahashi, 2007; Cong *et al.*, 2009)。虽然在昆虫中也发现了很多 i 型溶菌酶基因,但目前还没有对昆虫 i 型溶菌酶进行外源表达和研究其抗菌作用的相关报道。本研究将棉蚜 i 型溶菌酶基因与原核表达载体 pET-30a 重组,转入大肠杆菌中进行诱导外源蛋白表达,发现 *AgLYS* 能够在原核表达体系中正确表达,这为进一步研究棉蚜溶菌酶基因的功能和蛋白结构奠定了基础。

参考文献 (References)

- Bachali S, Jager M, Hassanin A, Schoentgen F, Jollès P, Fiala-Medioni A, Deutsch JS, 2002. Phylogenetic analysis of invertebrate lysozymes and the evolution of lysozyme function. *J. Mol. Evol.*, 54 (5): 652–664.
- Bathige SDNK, Umasuthan N, Kasthuri SR, Whang I, Lim BS, Nam BH, Lee J, 2013. A bifunctional invertebrate-type lysozyme from the disk abalone, *Halotis discus discus*: genome organization, transcriptional profiling and biological activities of recombinant protein. *Dev. Comp. Immunol.*, 41 (2): 282–294.
- Callewaert L, Michiels CW, 2010. Lysozymes in the animal kingdom. *J. Biosci.*, 35 (1): 127–160.
- Cong L, Yang X, Wang X, Tada M, Lu M, Liu H, Zhu B, 2009. Characterization of an i-type lysozyme gene from the sea cucumber *Stichopus japonicus*, and enzymatic and nonenzymatic antimicrobial activities of its recombinant protein. *J. Biosci. Bioeng.*, 107 (6): 583–588.
- Cui L, Zhang J, Qi HL, Wang QQ, Lu YH, Rui CH, 2016. Monitoring and mechanisms of imidacloprid resistance in *Aphis gossypii* (Hemiptera: Aphididae) in the main cotton production areas of China. *Acta Entomologica Sinica*, 59 (11): 1246–1253. [崔丽, 张靖, 齐浩亮, 王芹芹, 陆宴辉, 芮昌辉, 2016. 我国棉花主产区棉蚜对吡虫啉的抗性监测及抗性机理. 昆虫学报, 59 (11): 1246–1253]
- Demaio J, Pumpuni CB, Kent M, Beier JC, 1996. The midgut bacterial flora of wild *Aedes triseriatus*, *Culex pipiens*, and *Psorophora columbiae* mosquitoes. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 54 (2): 219–223.
- Dobson DE, Prager EM, Wilson AC, 1984. Stomach lysozymes of ruminants. I. Distribution and catalytic properties. *J. Biol. Chem.*, 259 (18): 11607–11616.
- Douglas AE, 1996. Reproductive failure and the free amino acid pools in pea aphids (*Acyrtosiphon pisum*) lacking symbiotic bacteria. *J. Insect Physiol.*, 42: 247–255.
- Evans JD, Aronstein K, Chen YP, Hetru C, Imler JL, Jiang H, Kanost M, Thompson GJ, Zou Z, Hultmark D, 2006. Immune pathways and defence mechanisms in honey bees *Apis mellifera*. *Insect Mol. Biol.*, 15 (5): 645–656.
- Feng MG, Poprawski TJ, 1998. Interaction between the aphid-specific fungus *Pandora neoaphidis* and the pea aphid *Acyrtosiphon pisum* at regimes of varying temperature and photoperiod simulating variable seasonal patterns. *Acta Entomologica Sinica*, 41 (2): 145–152. [冯明光, Poprawski TJ, 1998. 新蚜虫病毒与豌豆蚜在不同季节性光周期及恒变温组合下的互作反应. 昆虫学报, 41 (2): 145–152]
- Gerardo NM, Altincicek B, Anselme C, Atamian H, Barribeau SM, de Vos M, Duncan EJ, Evans J, Gabaldon T, Ghanim M, Heddi A, Kaloshian I, Latorre A, Moya A, Nakabachi A, Parker BJ, Perez-Brocail V, Pignatelli M, Rahbe Y, Ramsey JS, Spragg CJ, Tamames J, Tamarit D, Tamborindeguy C, Vincent-Monegat C, Vilcinskis A, 2010. Immunity and other defenses in pea aphids, *Acyrtosiphon pisum*. *Genome Biol.*, 11 (2): R21.
- Hufbauer RA, 2002. Aphid population dynamics: does resistance to parasitism influence population size? *Ecol. Entomol.*, 27: 25–32.
- International Silkworm Genome Consortium, 2008. The genome of a lepidopteran model insect, the silkworm *Bombyx mori*. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 38 (12): 1036–1045.
- Ito Y, Yoshikawa A, Hotani T, Fukuda S, Sugimura K, Imoto T, 1999. Amino acid sequences of lysozymes newly purified from invertebrates imply wide distribution of a novel class in the lysozyme family. *Eur. J. Biochem.*, 259: 456–461.
- Itoh N, Takahashi KG, 2007. cDNA cloning and in situ hybridisation of a novel lysozyme in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Comp. Biochem. Physiol. B*, 148: 160–166.
- Jollès P, Jollès J, 1984. What's new in lysozyme research. *Mol. Cell. Biochem.*, 63: 165–189.
- Koga R, Tsuchida T, Fukatsu T, 2003. Changing partners in an obligate symbiosis: a facultative endosymbiont can compensate for loss of the essential endosymbiont *Buchnera* in an aphid. *Proc. R. Soc. Lond. B*, 270: 2543–2550.
- Lukasik P, Dawid MA, Ferrari J, Godfray HCJ, 2013. The diversity and fitness effects of infection with facultative endosymbionts in the grain aphid, *Sitobion avenae*. *Oecologia*, 173 (3): 985–996.
- Matsumoto T, Nakamura AM, Takahashi KG, 2006. Cloning of cDNAs and hybridization analysis of lysozymes from two oyster species, *Crassostrea gigas* and *Ostrea edulis*. *Comp. Biochem. Physiol. B*, 145: 325–330.
- Nakabachi A, Shigenobu S, Sakazume N, Shiraki T, Hayashizaki Y, Carninci P, Ishikawa H, Kudo T, Fukatsu T, 2005. Transcriptome analysis of the aphid bacteriocyte, the symbiotic host cell that harbors an endocellular mutualistic bacterium, *Buchnera*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 102: 5477–5482.
- Nilsen IW, Myrnes B, 2001. The gene of chlamysin, a marine invertebrate-type lysozyme, is organized similar to vertebrate but different from invertebrate chicken-type lysozyme genes. *Gene*, 269 (1–2): 27–32.
- Nishikori K, Morioka K, Kubo T, Morioka M, 2009. Age- and morph-dependent activation of the lysosomal system and *Buchnera* degradation in aphid endosymbiosis. *J. Insect Physiol.*, 55: 351–357.
- Paskewitz SM, Li B, Kajla MK, 2008. Cloning and molecular characterization of two invertebrate-type lysozymes from *Anopheles gambiae*. *Insect Mol. Biol.*, 17 (3): 217–225.
- Qu XM, Lee SY, Wu KZ, Qiu XZ, Lou YC, Liu XY, Qi GR, 1985. Kinetics of the inducible lysozyme, antibacterial peptides and lectin from the pupae of oak silkworm *Antheraea pernyi* and silkworm *Bombyx mori* by injecting *Escherichia coli* D₃₁ or poly I:C. *Acta Entomologica Sinica*, 28 (1): 1–7. [屈贤铭, 李士云, 吴克佐, 邱雪贞, 娄艳春, 刘新垣, 祁国荣, 1985. 大肠杆菌及聚肌胞核苷酸对柞蚕、家蚕蛹诱导产生溶菌酶、抗菌肽及凝集素的动力学. 昆虫学报, 28 (1): 1–7]
- Ratzka C, Gross R, Feldhaar H, 2013. Gene expression analysis of the

endosymbiont-bearing midgut tissue during ontogeny of the carpenter ant *Camponotus floridanus*. *J. Insect Physiol.*, 59(6): 611 – 623.

Sakurai M, Koga R, Tsuchida T, Meng XY, Fukatsu T, 2005. *Rickettsia* symbiont in the pea aphid *Acyrtosiphon pisum*: novel cellular tropism, effect on host fitness, and interaction with the essential symbiont *Buchnera*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 71(7): 4069 – 4075.

Smith CD, Shu S, Mungall CJ, Karpen GH, 2007. The Release 5.1 annotation of *Drosophila melanogaster* heterochromatin. *Science*, 316(5831): 1586 – 1591.

Snyder WE, Ives AR, 2003. Interactions between specialist and generalist natural enemies: parasitoids, predators, and pea aphid biocontrol. *Ecology*, 84(1): 91 – 107.

Tao SX, Tian YZ, Xiao Y, Huang HL, 2014. Effects of temperature on development and humoral immune defense of *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae) larvae. *Acta Entomologica Sinica*, 57(5): 616 – 620. [陶淑霞, 田宇璋, 肖月, 黄海龙, 2014. 温度对黄粉虫幼虫生长发育及体液免疫防御能力的影响. 昆虫学报, 57(5): 616 – 620]

Vilcinskas A, Mukherjee K, Vogel H, 2013. Expansion of the antimicrobial peptide repertoire in the invasive ladybird *Harmonia axyridis*. *Proc. R. Soc. Lond. B*, 280(1750): 2012 – 2113.

Yu J, Wang DJ, Lei ZR, Wang HH, 2016. Identification and expression analysis on lysozyme gene of *Bemisia tabaci*. *Scientia Agricultura Sinica*, 49(13): 2534 – 2543. [于洁, 王登杰, 雷仲仁, 王海鸿, 2016. 烟粉虱溶菌酶基因的鉴定及表达分析. 中国农业科学, 49(13): 2534 – 2543]

Yu KH, Kim KN, Lee JH, Lee HS, Kim SH, Cho KY, Nam MH, Lee IH, 2002. Comparative study on characteristics of lysozymes from the hemolymph of three lepidopteran larvae, *Galleria mellonella*, *Bombyx mori*, *Agrius convolvuli*. *Dev. Comp. Immunol.*, 26(8): 707 – 713.

Zhang P, Jiang MF, Wang Y, 2012. Advance in studies of animal-borne lysozyme. *China Biotechnology*, 32(8): 87 – 93. [张鹏, 江明锋, 王永, 2012. 动物源溶菌酶研究进展. 中国生物工程杂志, 32(8): 87 – 93]

Zhang S, Ma Y, Min H, Yu XQ, Li N, Rui CH, Gao XW, 2016. Insecticide resistance monitoring and management demonstration of major insect pests in the main cotton-growing areas of northern China. *Acta Entomologica Sinica*, 59(11): 1238 – 1245. [张帅, 马艳, 闵红, 于晓庆, 李娜, 芮昌辉, 高希武, 2016. 华北棉区主要害虫抗药性监测与治理技术示范. 昆虫学报, 59(11): 1238 – 1245]

Zhang YC, Cao WJ, Zhong LR, Godfray HCJ, Liu XD, 2016. Host plant determines the population size of an obligate symbiont (*Buchnera aphidicola*) in aphids. *Appl. Environ. Microbiol.*, 82(8): 2336 – 2346.

(责任编辑: 马丽萍)